

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EXTRACELULAR SOBRE  
LA EXPRESIÓN DE GENES DE REGULACIÓN METABÓLICA Y LA  
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS CON LPS *IN VITRO***

**POR**

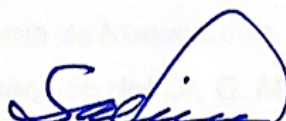
**L.N. KENIA YARETZY OSUNA ESPINOZA**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN  
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOLOGÍA MÉDICA**

**JUNIO 2021**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EXTRACELULAR SOBRE  
LA EXPRESIÓN DE GENES DE REGULACIÓN METABÓLICA Y LA  
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS CON LPS *IN VITRO***

**Aprobación de la Tesis.**



---

**Dr. C. Mario César Salinas Carmona**  
Director



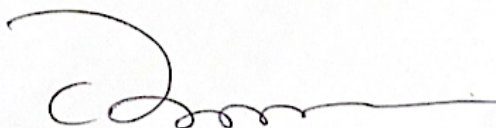
---

**Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres**  
Co-director



---

**Dr. C. Ana Velia Vázquez Marmolejo**  
Miembro de la Comisión



---

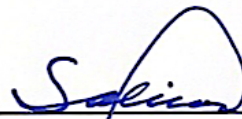
**Dr. med Felipe Arturo Morales Martínez**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EXTRACELULAR SOBRE  
LA EXPRESIÓN DE GENES DE REGULACIÓN METABÓLICA Y LA  
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS CON LPS *IN VITRO***

**Presentado por: L.N. Kenia Yarety Osuna Espinoza**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. Mario César Salinas Carmona y la co-dirección del Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres.

Autorizado por el Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" con el número de registro: **IN20-00005**



**Dr. C. Mario César Salinas Carmona**

Director de Tesis



**Dr. C. Manuel Guadalupe Mejía Torres**

Co-director de Tesis



**Dr. C. Ana Vena Vázquez Marmolejo**

Miembro de la comisión

## DEDICATORIA

A mi papá, Ignacio Osuna, por ser un apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, cultivar en mí el amor a la ciencia y ser mi ejemplo a seguir. Gracias por siempre estar,  
te amo.

A mi mamá Juany Espinoza, porque en vida me enseñaste a ser una mujer fuerte y a saber enfrentar cada obstáculo. Gracias por luchar hasta el fin y por siempre estar en  
mis sueños cuando te necesito.

A mis hermanos: Brayan Ignacio, gracias por cuidarme y brindarme el soporte que a veces me hace falta. A Grecia Estefanía, por ser mi mejor amiga y confidente.

A mi novio, Carlos Díaz, por impulsar cada una de mis metas y hacerme sentir acompañada en el proceso. Gracias infinitas por todo el amor que siempre será mutuo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Departamento de Inmunología y a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, por brindarme las herramientas necesarias para mi formación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, que mediante el programa de apoyo financiero participó en la culminación de mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis y jefe del Departamento de Inmunología, el Dr. Mario César Salinas Carmona, por permitirme formar parte de este posgrado, compartir sus conocimientos y fomentar mi interés en la inmunología.

Al Dr. Manuel Guadalupe Mejía Torres, co-director de este proyecto, por brindarme su apoyo incondicional, compartir conmigo su experiencia profesional y guiarme durante el desarrollo de esta investigación. Gracias por sumergirme al mundo de la ciencia, mostrarme el verdadero valor de la investigación científica y resolver todas esas dudas de conocimiento que me surgieron en el camino.

A la Dra. Anna Velia Vázquez Marmolejo, miembro de la comisión de tesis, por ser una excelente profesora y un gran ser humano.

A todos los profesores del departamento de inmunología: Dra. Alma Yolanda Arce, Dra. Nayelli López, Dr. Noé Macías, Dr. Carlos Medina, Dra. Ángeles Castro, Dr. Adrián Rosas. Por ser la base y el inicio de mi conocimiento en el área de inmunología.

A mis compañeros de posgrado por todos los momentos agradables que pasamos juntos y volvieron este camino más sencillo.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>2</b>
MARCO TEÓRICO .....	2
2.1 Diabetes Mellitus .....	2
2.2 Macrófagos como mediadores inflamatorios .....	3
2.3 Efecto de la hiperglucemia en la activación de macrófagos .....	5
2.4 Inmunometabolismo de macrófagos e inflamación .....	6
2.5 Regulación del metabolismo energético .....	10
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>14</b>
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	14
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>15</b>
JUSTIFICACIÓN .....	15
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>16</b>
HIPÓTESIS .....	16
<b>CAPÍTULO 6</b> .....	<b>17</b>
OBJETIVOS .....	17
6.1 Objetivo General .....	17
6.2 Objetivos Específicos .....	17
<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>18</b>
ESTRATEGIA GENERAL .....	18
<b>CAPÍTULO 8</b> .....	<b>19</b>
DISEÑO DEL ESTUDIO .....	19
8.1 Tipo de muestreo .....	19
8.2 Criterios de selección .....	19
<b>CAPÍTULO 9</b> .....	<b>20</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	20

9.1 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre venosa periférica ..	20
9.2 Diferenciación de macrófagos por el método de adherencia .....	20
9.3 Activación de macrófagos por LPS y exposición a niveles altos de glucosa extracelular.....	21
9.4 Cuantificación de la expresión de ARN mensajero por RT-qPCR .....	21
9.5 Análisis de marcadores de activación por citometría de flujo .....	23
9.6 Ensayos de fagocitosis .....	23
9.7 Estrategia de análisis para ensayo de fagocitosis por citometría de flujo.....	24
9.8 Análisis estadístico.....	24
9.9 Análisis e interpretación de la información.....	24
<b>CAPÍTULO 10 .....</b>	<b>25</b>
RESULTADOS .....	25
10.1 Comparación de la expresión de marcadores de activación CD80 y CD86 entre condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol. ....	25
10.2 Comparación de la capacidad fagocítica entre macrófagos activados con LPS en condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.....	27
10.3 Comparación de la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria entre las condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol. ....	29
<b>CAPÍTULO 11 .....</b>	<b>31</b>
DISCUSIÓN .....	31
<b>CAPÍTULO 12 .....</b>	<b>36</b>
CONCLUSIÓN .....	36
<b>CAPÍTULO 13 .....</b>	<b>37</b>
PERSPECTIVAS .....	37
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>44</b>
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Página
<b>Tabla 1</b>	
Secuencias <i>forward</i> y <i>reverse</i> de los genes a evaluados	23



## ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido		Página
<b>Figura 1</b>	Perfil bioenergético de macrófagos M1 y M2	8
<b>Figura 2</b>	Señales metabólicas generadas en macrófagos M1	9
<b>Figura 3</b>	Esquema de la estrategia general del experimento.	18
<b>Figura 4</b>	Imágenes representativas de la intensidad media de fluorescencia de CD80 y CD86 obtenida de una muestra en concentración de glucosa 10 mmol.	25
<b>Figura 5</b>	Imágenes representativas de la intensidad media de fluorescencia de CD80 y CD86 obtenida de una muestra en concentración de glucosa 25 mmol.	26
<b>Figura 6</b>	Comparación de la expresión de marcadores de activación CD80 y CD86 entre condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.	26
<b>Figura 7</b>	Imágenes representativas de una muestra para la estrategia de análisis empleada en el citómetro de flujo LSRFortessa.	27
<b>Figura 8</b>	Porcentaje de células fagocíticas en concentración de glucosa 10 mmol.	28
<b>Figura 9</b>	Comparación del porcentaje de fagocitos en células cultivadas en condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.	29
<b>Figura 10</b>	Comparación de la expresión relativa de SIRT1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 y AMPK entre macrófagos cultivados en concentraciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.	30

## ABREVIATURAS

DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2
OMS	Organización Mundial de la Salud
IDF	Federación Internacional de Diabetes
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones moleculares
LPS	Lipopolisacárido
MDM	Macrófagos derivados de monocitos
CMN	Células mononucleares
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
IFN $\gamma$	Interferón- $\gamma$
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TLR	Receptores tipo Toll
CIITA	Transactivador del complejo mayor de histocompatibilidad clase II
COX-2	Ciclooxigenasa 2
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
IL1R	Receptor para la interleucina 1
GLUT1	Transportadores de glucosa 1
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
RAGE	Receptores de productos finales de glucosilación avanzada

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Arg-1	Arginasa 1
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-6	Interleucina 6
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida-adenosina-dinucleótido
TCA	Ácidos tricarboxílicos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
SDH	Succinato deshidrogenasa
HK2	Hexocinasa 2
PFKFB3	Fructosa-2,6-bifosfatasa 3

LDH	Lactato deshidrogenasa
AMPK	Proteína cinasa activada por AMP
SIRT1	Sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD <sup>+</sup>
PPAR $\alpha$	Receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
PGC-1 $\beta$	Coactivador del receptor gamma 1-beta activado por el proliferador de peroxisomas
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
HIF1 $\alpha$	Factor 1-alfa inducible por hipoxia
PMMA	Perlas de polimetilmetacrilato
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
PBS	Solución amortiguada por fosfatos
rpm	Revoluciones por minuto
FBS	Suero fetal bovino
DEPC	Dietilpirocarbonato
ADNc	ADN complementario
SSC	<i>Side Scatter</i> o detección de fluorescencia con dispersión lateral.
FSC	<i>Forward Scatter</i> o detección de fluorescencia con dispersión frontal

## RESUMEN

**L.N. Kenia Yaretzy Osuna Espinoza**

**Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina**

**Título del trabajo:** “Efecto de la concentración de glucosa extracelular sobre la expresión de genes de regulación metabólica y la diferenciación de macrófagos con LPS *in vitro*”.

**Número de páginas:** 44

**Área de Estudio:** Inmunología Médica.

**Introducción.** La hiperglucemia induce alteraciones metabólicas en macrófagos relacionadas con un fenotipo proinflamatorio. Identificar estas alteraciones a nivel de vías metabólicas es complejo, por lo que estudiar la expresión de genes de regulación inflamatoria y metabólica permitirá simplificar el estudio de la relación entre metabolismo e inflamación con implicaciones sobre la fisiopatología de enfermedades como Diabetes. **Objetivo.** Evaluar el efecto de la concentración de glucosa extracelular sobre la expresión de genes de regulación metabólica y fenotipo de activación en macrófagos estimulados con LPS *in vitro*. **Métodos.** Macrófagos derivados de Monocitos (MDM), obtenidos de sujetos sanos y activados con lipopolisacárido (LPS, 100 ng/mL) se cultivaron en medio RPMI con glucosa 10 mmol y 25 mmol. Tras 72 horas de cultivo se realizó la extracción de ácidos nucleicos para cuantificar la expresión de los genes SIRT1, AMPK, HIF1 $\alpha$  y GLUT1 por PCR cuantitativa. Además, se evaluaron marcadores de activación (CD80 y CD86) y fagocitosis (con perlas de polimetilmetacrilato) por citometría de flujo. **Resultados.** Tras 72 horas de cultivo, no encontramos diferencias en expresión de genes (SIRT1, AMPK, HIF1a y GLUT1,  $p>0.05$ ), presencia de marcadores de activación (CD80/CD86) y fagocitosis entre las condiciones de glucosa estudiadas (10 mmol y 25 mmol). **Conclusión.** Los niveles de glucosa extracelular no modifican la expresión de genes metabólicos, fagocitosis y marcadores de activación en MDM activados con LPS *in vitro*.

**Palabras clave:** Hiperglucemia, macrófagos, metabolismo, SIRT1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1, AMPK.

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus es una de las enfermedades metabólicas más prevalente a nivel mundial, la principal característica de esta enfermedad es el estado de hiperglucemia el cual se asocia al desarrollo de diversas complicaciones. Actualmente se ha destacado la participación de la hiperglucemia en el establecimiento de un estado de inflamación crónica de bajo grado en estos pacientes.

En este sentido, los macrófagos juegan un papel importante al ser células del sistema inmune innato que participan directamente en el proceso inflamatorio. Diferentes hallazgos han demostrado que el metabolismo celular tiene un efecto directo sobre el fenotipo de estas células, identificándose un perfil bioenergético distinto para cada uno de estos. Por una parte, se ha establecido que los macrófagos del fenotipo M1 o inflamatorio llevan a cabo la obtención de energía principalmente por un metabolismo de glucólisis anaerobia, mientras que los macrófagos del fenotipo M2 ejercen un metabolismo oxidativo en mayor medida.

La relación entre el metabolismo celular y las funciones efectoras de los macrófagos es clara, cambios en el metabolismo genera cambios en el fenotipo de los macrófagos. Sin embargo, aún falta mucho por conocer acerca de las modificaciones que se establecen a nivel de vías de señalización intracelular. Algunos hallazgos han destacado la participación de diferentes proteínas como reguladoras del metabolismo y la inflamación, formando un vínculo entre los recursos energéticos de los macrófagos y su polarización.

De esta manera podemos observar al estado de hiperglucemia como un escenario de exceso de nutrientes, el cual puede tener efectos sobre el fenotipo de los macrófagos, por lo que, resulta imprescindible evaluar los posibles cambios a nivel intracelular.

## **CAPÍTULO 2**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Diabetes Mellitus**

La Diabetes Mellitus es una enfermedad metabólica caracterizada por la presencia de hiperglucemia, definida por niveles de glucosa en plasma superiores a 126 mg/dL. Según su etiología, la diabetes puede clasificarse en: gestacional, tipo 1 y tipo 2, esta última con la mayor prevalencia a nivel mundial. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica que aparece cuando el organismo no produce la insulina suficiente para regular las concentraciones de glucosa en plasma. Por tanto, la hiperglucemia es consecuencia y cuando no es controlada de manera adecuada daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y vasos sanguíneos (1).

Los principales factores de riesgo asociados al desarrollo de DM2 son factores modificables relacionados con el estilo de vida, como el sedentarismo, una alimentación inadecuada con exceso en el consumo de lípidos y carbohidratos, exceso de peso corporal (sobrepeso u obesidad), entre otros (2).

La organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 3.4 millones de muertes al año en todo el mundo son atribuidas a la DM2 y según datos de la Federación Internacional de Diabetes (*IDF*) para el año 2040 habrá 642 millones de personas con diabetes en el mundo (3,4). En México el panorama no es diferente, en el año 2018 se registraron 8.6 millones de personas que padecen diabetes y se prevé que este número aumente considerablemente (5,6).

El tratamiento médico y nutricional de la DM2 tiene como principal objetivo disminuir los niveles de glucosa en plasma y así evitar las complicaciones crónicas. La alimentación juega un papel importante en el tratamiento de DM2 y se basa en el establecimiento de un estilo de vida saludable, disminución del consumo de alimentos con elevado índice glucémico, incorporación de granos enteros y ácidos grasos

monoinsaturados en la dieta y aumento de la actividad física. Estas acciones tienen el objetivo de disminuir el porcentaje de grasa corporal, mejorar la resistencia a la insulina y normalizar los niveles de glucosa en plasma (7).

El estado crónico de hiperglucemia que presentan los pacientes con DM2 representa grandes riesgos en el desarrollo de complicaciones. Actualmente se conoce que la hiperglucemia tiene efectos directos a nivel macro y microvasculares, contribuyendo al desarrollo de enfermedad cardiovascular, nefropatía, neuropatía y retinopatía, por mencionar algunas (3).

En general, se identifica que muchas de las enfermedades metabólicas como la diabetes, obesidad, gota e hipertensión arterial, cursan con un estado de inflamación crónica asociada al desarrollo de complicaciones. Por esta razón, se acuñó el término "metainflamación" para describir el estado de inflamación crónica de bajo grado ligada a enfermedades metabólicas y donde los macrófagos tienen una participación importante por ser células directamente relacionadas con la liberación de mediadores inflamatorios (8,9,10,11).

## **2.2 Macrófagos como mediadores inflamatorios**

Los macrófagos son células que forman parte del sistema inmune innato, provienen de monocitos que persisten en la circulación sanguínea durante 4–7 días y luego migran a los tejidos en donde se diferencian en macrófagos residentes de tejido para desempeñar un papel importante como primera línea de defensa del organismo frente a patógenos (8,12).

Éstas células son muy versátiles ya que pueden adquirir funciones especializadas en determinadas localizaciones y en respuesta a diversas señales. Dentro de las principales funciones de los macrófagos destacan su participación como células fagocíticas, células presentadoras de antígenos y su actividad en la reparación de tejidos (13).



Entre las características más importantes de los macrófagos está su participación como mediadores de inflamación, lo cual es posible por su ubicuidad, el tiempo de vida útil (que va de días a semanas), la expresión de *PRRs*, la capacidad para realizar quimiotaxis y la memoria inespecífica que presentan a través de reprogramación epigenética. Todas estas características convierten a los macrófagos en guardianes de la defensa inespecífica del huésped, pero son estas mismas características las que contribuyen al desarrollo de un estado de inflamación crónica tras la activación constante por diversos estímulos (14).

La plasticidad de los macrófagos se refleja en los diferentes fenotipos que presentan en respuesta al microambiente tisular y a los estímulos que reciben. De forma general, pueden identificarse dos estados efectores distintos o estados de polarización ampliamente reconocidos, el fenotipo M1 y M2 (15,16).

El fenotipo M1 o clásico, también conocido como pro-inflamatorio, es inducido por estímulos como el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) y ligandos de receptores tipo Toll (TLR) como el lipopolisacárido (LPS). En respuesta a su estímulo, estas células secretan citocinas proinflamatorias, producen especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, así como mediadores con actividad microbicida para eliminar eficientemente a los microorganismos. Su identificación se realiza por la expresión de marcadores de superficie como CD80, CD86, *CIITA*, ciclooxigenasa 2 (COX-2) y receptor del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) (17).

Por otra parte, los macrófagos del fenotipo M2, o de activación alternativa, son inducidos por citocinas del perfil Th2 (IL-4 e IL-13). Dependiendo de los estímulos, estas células se pueden subclasificar en M2a (IL-4 o IL-12), M2b (IL-10) y M2c (complejos inmunológicos y LPS) (15). Las funciones asociadas al fenotipo M2 incluyen la inmunoregulación, la reparación de tejido, el combate de infecciones por helmintos y, en terrenos patológicos, mediar el desarrollo de enfermedades como el asma. A nivel molecular, éstos se caracterizan por expresar marcadores de superficie como el receptor de manosa CD206 y el receptor para la interleucina 1 (IL1R) (18).

Dentro de los receptores de patrones moleculares (*PRRs*) expresados en macrófagos se incluyen TLR2, TLR4, *Mincle*, NOD1/2 y NLRP3. Estos receptores están implicados en el reconocimiento de factores metabólicos y señales endógenas de daño lo que se traduce en una respuesta inflamatoria en respuesta al estrés metabólico o celular. El estrés metabólico y celular es una característica común a muchas enfermedades metabólicas, entre ellas la diabetes (12).

### **2.3 Efecto de la hiperglucemia en la activación de macrófagos**

Estudios previos han reportado en células del sistema inmune innato expuestas a condiciones de glucosa alta, mayor expresión de transportadores de glucosa (*GLUT1*), mayor expresión de moléculas de adhesión y un aumento de los receptores de patrones moleculares (*PRRs*) que responden a señales de daño (*DAMPs*) y promueven la producción de citocinas proinflamatorias (19,20,21).

En el caso particular de los macrófagos, diversos estudios *in vitro* han reportado que cuando estas células se exponen a concentraciones altas de glucosa presentan mayor expresión de receptores tipo TLR, *GLUT1* y receptores de productos finales de glucosilación avanzada (*RAGE*); esto promueve la activación celular y un aumento de la producción de citocinas proinflamatorias (22). En las mismas condiciones de glucosa alta, otros estudios han encontrado aumento en la expresión de genes proinflamatorios, la activación del inflammasoma y un aumento en las moléculas de adhesión (2,12,23,24,25). Estos cambios implican una relación directa entre los niveles de glucosa en el medio extracelular y la activación de los macrófagos (26).

Torres-Castro y colaboradores identificaron que las altas concentraciones de glucosa tienen efectos directos sobre la polarización de los macrófagos humanos hacia un fenotipo similar a M1, caracterizado por la regulación positiva de CD11c e iNOS y la regulación negativa de Arg-1 e IL-10 (2). De la misma manera, Lachmandas y colaboradores demostraron que la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias en macrófagos (IL-6, TNF $\alpha$ ) es mayor en condiciones de glucosa alta (40 mmol/L)

comparado con glucosa normal (5 mmol/L), bajo condiciones de osmolaridad controlada (23).

Estos hallazgos sugieren que el estado de hiperglucemia "prepara" los monocitos, induciendo cambios en el programa transcripcional, mientras que un claro fenotipo proinflamatorio evoluciona posterior a la reestimulación. Por lo tanto, la evidencia sugiere que la hiperglucemia crónica, el sello distintivo de la diabetes, se asocia con una activación (de bajo grado) de los macrófagos (12).

Es importante considerar que la respuesta primaria de los macrófagos ante diversos estímulos se produce a nivel transcripcional, por lo que en la actualidad los esfuerzos cinéticos para identificar los mecanismos relacionados entre las enfermedades metabólicas y la inflamación se han centrado a nivel epigenético.

#### **2.4 Inmunometabolismo de macrófagos e inflamación**

Todas las células dependen de una secuencia organizada de reacciones anabólicas y catabólicas para producir un suministro constante de energía que es utilizada para la realización de las diferentes funciones celulares, a este proceso se le conoce como metabolismo (27).

Las células del sistema inmunológico, como los macrófagos, no son la excepción. Los primeros estudios realizados en el campo del metabolismo de las células del sistema inmunológico aparecieron en la década de 1950, cuando se descubrió que la activación de los neutrófilos depende de la glucólisis, un proceso definido como "efecto Warburg". Este mecanismo fue descrito por Otto Warburg durante su investigación sobre el metabolismo de las células tumorales, caracterizado por mayor absorción de glucosa y aumento de glucólisis anaerobia con disminución de la fosforilación oxidativa, incluso en concentraciones altas oxígeno (28).

Más tarde, en 1970 comenzaron las primeras investigaciones sobre los cambios metabólicos de los macrófagos (29). Estos descubrimientos llevaron al desarrollo del inmunometabolismo, una nueva área de la inmunología, donde se estudia cómo el

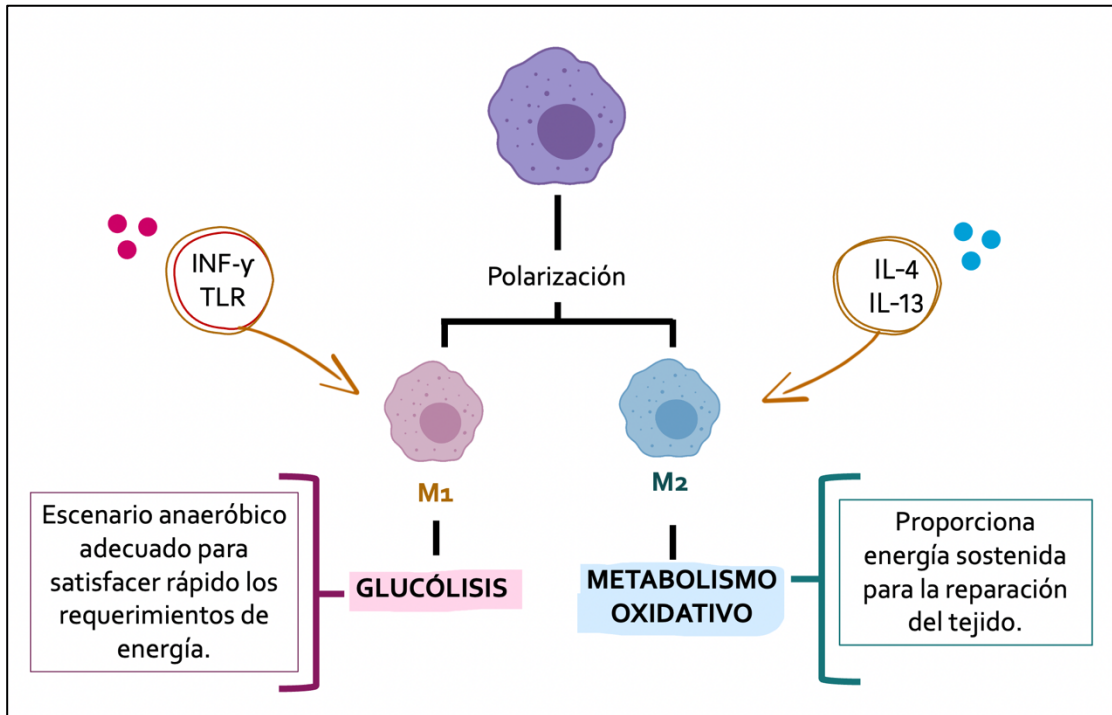
metabolismo es imprescindible para el control de la activación de células del sistema inmunológico (30).

El estudio del metabolismo es complejo, pues son muchas las enzimas, los intermediarios y las reacciones metabólicas que se coordinan para satisfacer las necesidades energéticas de la célula.

Desde esta perspectiva, la glucosa es el sustrato central en el proceso de obtención de energía. En la glucólisis, la glucosa se utiliza para generar ATP, este proceso llevado a cabo en el citoplasma requiere 10 pasos enzimáticos altamente regulados que dan como resultado 2 moléculas de piruvato, 2 moléculas de ATP y 2 equivalentes reductores NADH por cada molécula de glucosa (31). A partir del piruvato, en el interior de la mitocondria se generan otras 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa por el paso secuencial del ciclo de Krebs seguido de la fosforilación oxidativa (13).

De estas reacciones intracelulares dependen no solamente la generación de energía, sino también el estado de activación de las células inmunes en la inflamación crónica, pues la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios depende de la activación de la transcripción y esta depende a su vez de la síntesis de intermediarios metabólicos que permitan la regulación epigenética de la transcripción (12).

De esta manera, ahora sabemos que los macrófagos M1 o inflamatorios utilizan la glucólisis anaerobia para obtener energía de forma rápida y así poder realizar sus funciones efectoras como la generación de especies reactivas de oxígeno, aún a pesar de ser la glucólisis anaeróbica una vía metabólica ineficiente para la generación de ATP (32,33,34,35). Mientras que los macrófagos del fenotipo M2 utilizan preferentemente la fosforilación oxidativa como vía de obtención de energía, ya que permite el aporte constante de ATP durante el proceso de reparación de tejidos, una de las funciones características de este fenotipo de macrófagos (figura 1) (15,36,37).



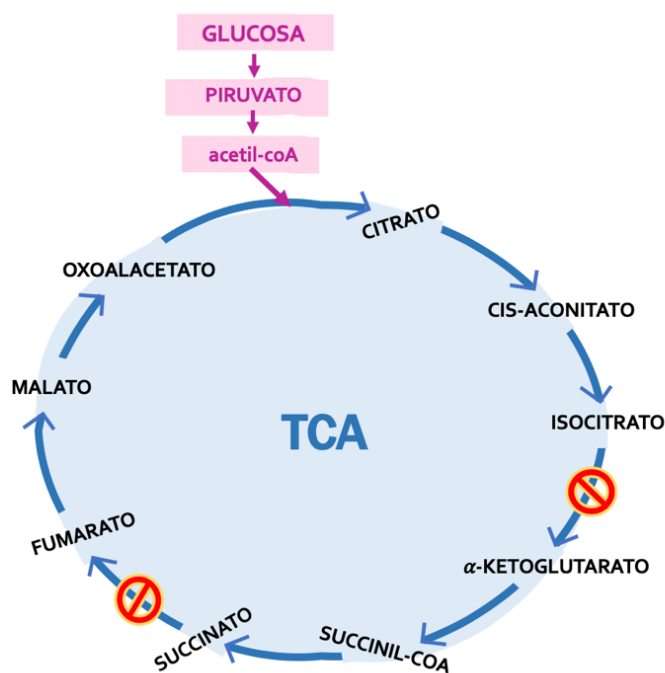
**Figura 1.** Perfil bioenergético de macrófagos M1 y M2.

Interesantemente, Van den Bossche y colaboradores demostraron que el fenotipo M2 podía redirigirse hacia el fenotipo M1 por la presencia de un estímulo de diferenciación M1 como LPS + IFN $\gamma$ ; por el contrario, no se observó el cambio M1 a M2 con el uso de IL-4 como estímulo polarizante M2, debido a que el ciclo TCA se encuentra interrumpido en dos puntos clave lo que impide el cambio funcional requerido (18,38).

La primera interrupción se ubica en la regulación negativa de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH), lo que produce la acumulación del precursor isocitrato y citrato, el cual interviene en la producción de tres mediadores inflamatorios (prostaglandinas, óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno); estos son mecanismos importantes para la capacidad microbicida de los macrófagos M1. La segunda interrupción del ciclo se presenta por la inhibición competitiva de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), que permite la conversión de succinato a fumarato, provocando la acumulación de succinato y la consecuente estabilización de HIF1 $\alpha$  (figura 2) (39).

La interrupción del ciclo TCA que culmina con la estabilización de HIF1 $\alpha$  es esencial para el mantenimiento de la glucólisis anaerobia mediante la activación de varios genes glucolíticos que codifican para el transportador de glucosa *GLUT1*, así como enzimas que participan directamente en la glucólisis como la enzima hexocinasa 2 (HK2) y la enzima fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3) (29,40). A su vez, HIF1 $\alpha$  induce la expresión de las enzimas lactato deshidrogenasa y piruvato deshidrogenasa, las cuales permiten la conversión de piruvato a lactato, impidiendo la utilización del piruvato como sustrato para el ciclo de Krebs (15,36,41).

Adicional a este proceso, la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, por parte de los macrófagos M1, se ha identificado como punto clave en la inhibición de la función mitocondrial, pudiendo ser éste un factor importante en el mantenimiento del fenotipo inflamatorio en estas células (18,41).



**Figura 2.** Señales metabólicas generadas en macrófagos M1

## **2.5 Regulación del metabolismo energético**

Aunque el metabolismo y la polarización de los macrófagos están regulados por muchos factores, los mecanismos son interdependientes. Se encuentra establecido que procesos metabólicos como la glucólisis, el ciclo de Krebs y el metabolismo de ácidos grasos tienen efectos específicos en las células inmunes como los macrófagos y pueden alterar dramáticamente la función de estas células. Debido a esto, la regulación del metabolismo celular es un factor importante en la respuesta inmune (34).

Recientemente se ha tratado de abordar la relación que existe entre la señalización intracelular, las vías metabólicas y el efecto de los intermediarios metabólicos sobre la transcripción de genes que llevará a cambios celulares en el macrófago. De esta manera, se han identificado varios reguladores del metabolismo como puntos clave de control en la activación y el desarrollo fenotípico de los macrófagos (15).

### **Proteína cinasa activada por AMP (AMPK)**

Uno de los sensores energéticos clave que regula la homeostasis metabólica e inflamatoria es AMPK, un complejo heterotrimérico formado por una subunidad  $\alpha$ , una  $\beta$  y la subunidad  $\gamma$  reguladora. La fosforilación de AMPK en un residuo de treonina provoca su activación, lo que promueve procesos catabólicos como la glucólisis, al tiempo que inhibe aquéllos que consumen energía, como la síntesis de proteínas y la proliferación celular; esto aumenta los niveles de ATP de la célula (42).

AMPK es capaz de responder a una amplia variedad de estímulos, incluidos el estrés celular, la presencia de hormonas y de citocinas. Los estímulos inflamatorios, como LPS o los estados de exceso de nutrientes como ácidos grasos libres y glucosa, provocan disminución de la activación de AMPK; por lo tanto, es probable que AMPK participe en el cambio de fenotipo en las células del sistema inmune, a través de mecanismos como la reprogramación metabólica y la inhibición directa de proteínas inflamatorias clave (10).

Diversos estudios *in vivo* han confirmado el papel de AMPK como regulador metabólico e inflamatorio. En ratones deficientes de AMPK se ha descrito una disminución en la tasa de consumo de oxígeno, es decir, disminuye la utilización de la fosforilación oxidativa como fuente de energía (43). Datos similares se reportaron *in vitro* por Yang y colaboradores, quienes observaron que al activar AMPK (utilizando *AICAR*) disminuye la expresión de TNF- $\alpha$  en macrófagos RAW264.7 estimulados con LPS (44).

### **Sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup> (SIRT1)**

Otro regulador metabólico importante es SIRT1 (o sirtuina-1 desacetilasa dependiente de NAD<sup>+</sup>). Esta proteína pertenece a la familia de las sirtuinas, compuesta por siete miembros en el humano, SIRT1 a SIRT7. Originalmente las sirtuinas fueron reconocidas como "proteínas de la longevidad" por su asociación con los procesos de senescencia. Actualmente se consideran proteínas importantes en la fisiología celular, ya que, entre otros procesos, participan en la biogénesis mitocondrial (45).

A nivel molecular, las sirtuinas son enzimas desacetilasas, es decir, eliminan el grupo acetilo de las proteínas, con lo que modifican la capacidad de interacción de la proteína con otras biomoléculas. En algunos casos, las sirtuinas también eliminan otros grupos químicos como el carbonilo, el propileno y el succinilo, todas estas modificaciones postranscripcionales (46).

SIRT1 es la sirtuina más estudiada en los mamíferos, se expresa en tejidos como el hígado, tejido adiposo y músculo. Esta proteína se activa en condiciones de privación de energía y requiere de nicotinamida-adenosina-dinucleótido (NAD) como cofactor; al activarse, reprime la expresión de PPAR $\alpha$ , regula el metabolismo de los lípidos y activa PGC-1 $\beta$ ; lo que lleva a mayor oxidación de los ácidos grasos y promueve el metabolismo oxidativo. Asociados a estos cambios metabólicos las sirtuinas regulan indirectamente procesos celulares como la inflamación, la apoptosis, la senescencia celular, el estrés oxidativo y la biogénesis mitocondrial (46,47).



SIRT1 regula la inflamación por medio de la desacetilación de la subunidad p65 de NF- $\kappa$ B, limitando así la expresión de genes de citocinas inflamatorias (48,49).

Algunos estudios han subrayado la relación inversa que existe entre SIRT1 y los niveles de citocinas proinflamatorias. Por ejemplo, Li y colaboradores observaron una correlación negativa entre la expresión de SIRT1 y la secreción de IL-6 y TNF- $\alpha$ , en células mononucleares circulantes de pacientes con enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 (50). Así mismo, Lei y colaboradores observaron la disminución en la expresión de *iNOS*, enzima característica del perfil inflamatorio de macrófagos, en células expuestas a cristales de ácido úrico, tratadas previamente con resveratrol, un activador de SIRT1 (51). En conjunto, estos trabajos refuerzan el papel de SIRT1 como regulador metabólico e inflamatorio (52,53).

SIRT1 puede ser regulada por otros factores como AMPK y además desacetilar factores distintos a NF- $\kappa$ B como el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), el cual es clave en las respuestas proinflamatorias (54).

### **Factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ )**

HIF1 $\alpha$  es otro factor importante que interviene en el metabolismo y la regulación de la respuesta inmunológica. Desempeña un papel clave en la regulación de las vías glucolíticas tomando como factor la disponibilidad de oxígeno. En células mieloides, el cambio metabólico de la fosforilación oxidativa a la glucólisis anaerobia, durante la activación, requiere de la participación de HIF1 $\alpha$  (54).

La activación de HIF1 $\alpha$  promueve la expresión de genes implicados en la glucólisis como aquéllos que codifican para las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato deshidrogenasa cinasa, el transportador de glucosa 1 (GLUT1) y la enzima 6-fosfofructo 2-kinasa/fructosa 2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3). Además, HIF1 $\alpha$  es un factor transcripcional fundamental en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios como IL-1 $\beta$  (54).

La regulación de HIF1 $\alpha$  puede ser mediada por metabolitos como el succinato y el piruvato. El succinato, un producto del metabolismo de la glutamina, se acumula durante la activación de los macrófagos y afecta a la actividad de HIF1 $\alpha$  (54). Diversos estudios han demostrado la participación de HIF1 $\alpha$  en la regulación de la polarización de los macrófagos, mediante el metabolismo de la glucosa. Wang y colaboradores reportaron que la sobreexpresión de HIF1 $\alpha$  en ratones induce la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M1, al mismo tiempo que disminuye la expresión de genes relacionados con el metabolismo oxidativo (55).

De esta manera, se establece una estrecha relación entre reguladores del metabolismo y la inflamación, sin embargo, aún quedan muchas interrogantes sin respuesta en el área del inmunometabolismo. Hasta el día de hoy se han realizado esfuerzos importantes para comprender el proceso proinflamatorio que subyace a muchas de las enfermedades metabólicas, especialmente en la etapa temprana que involucra cambios en la expresión génica, aunque las cascadas de señalización intracelular, que median los efectos de la glucosa alta en la producción de factores proinflamatorios y el cambio de fenotipo en macrófagos, no se han caracterizado claramente.

### **CAPÍTULO 3**

#### **DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Los datos revisados en la sección anterior sugieren que las condiciones de glucosa alta pueden inducir cambios epigenéticos que alteran la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria, un mecanismo de interés en la fisiopatología de las complicaciones crónicas de la diabetes. Un primer abordaje es el estudio de los cambios transcripcionales asociados a la diferenciación de macrófagos en condiciones de glucosa alta.

Debido a esto, nos planteamos la siguiente **pregunta de investigación**:

¿Cuál es el efecto de la concentración elevada de glucosa sobre la expresión de genes de regulación metabólica y la diferenciación de macrófagos con LPS?

## **CAPÍTULO 4**

### **JUSTIFICACIÓN**

Las concentraciones altas de glucosa inducen alteraciones metabólicas en macrófagos relacionadas con un fenotipo proinflamatorio. Identificar estas alteraciones a nivel de metabolismo es complejo, por lo que el estudio de la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria nos permitirá evaluar la presencia de cambios transcripcionales, asociados a la exposición de condiciones de glucosa alta en un modelo *in vitro* de diferenciación de macrófagos.

## **CAPÍTULO 5**

### **HIPÓTESIS**

El aumento en la concentración de glucosa extracelular cambia la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria comparado con glucosa basal en un modelo *in vitro* de diferenciación de macrófagos con LPS.

## **CAPÍTULO 6**

### **OBJETIVOS**

#### **6.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la concentración de glucosa extracelular sobre la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria y la diferenciación de macrófagos con LPS in vitro.

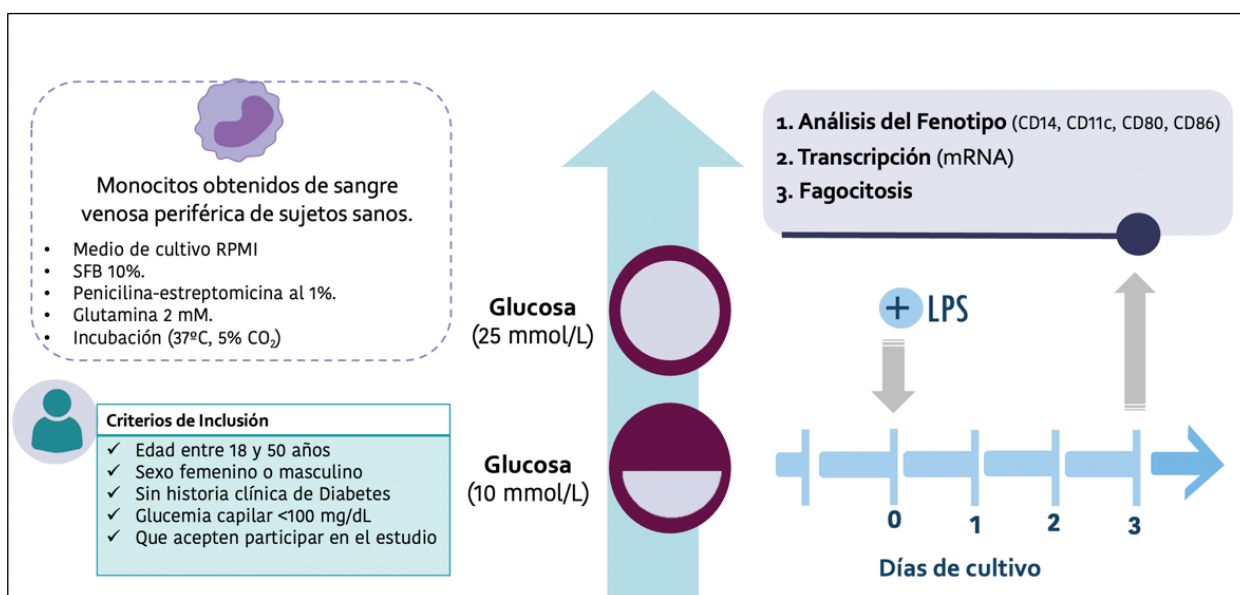
#### **6.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar los marcadores de activación y capacidad fagocítica de macrófagos activados con LPS derivados de monocitos de sujetos sanos en condiciones de glucosa normal.
2. Cuantificar la expresión de los genes *GLUT1*, *HIF1A*, *SIRT1* y *AMPKA1* en macrófagos activados con LPS derivados de monocitos de sujetos sanos en condiciones de glucosa normal.
3. Analizar el efecto de la concentración alta de glucosa sobre la expresión de los genes *GLUT1*, *HIF1A*, *SIRT1* y *AMPKA1*, marcadores de activación y capacidad fagocítica de macrófagos activados con LPS derivados de monocitos de sujetos sanos.

## CAPÍTULO 7

### ESTRATEGIA GENERAL

Como estrategia general, se obtuvieron células mononucleares (CMN) a partir de sangre venosa periférica de donadores sanos que cumplieron con los criterios de inclusión. La selección de macrófagos se realizó por el método de adherencia, el cual consiste en un cultivo de las CMN en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, glutamina 2 mmol y glucosa 10 mmol durante 24 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente se realizó el cambio de medio para conservar las células adherentes añadiendo como estímulo de activación lipopolisacáridos bacterianos (LPS, 100 ng/mL) y medio fresco con glucosa al 10 mmol o 25 mmol. Tras 72 horas de cultivo se evaluó la presencia de los marcadores de activación CD80 y CD86, la función fagocítica con perlas de polimetilmetacrilato (PMMA) y se realizó la extracción de ácidos nucleicos para evaluar la expresión de los genes SIRT1, AMPK, HIF1 $\alpha$  y GLUT1 por PCR cuantitativa en tiempo real (figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la estrategia general del experimento.

## **CAPÍTULO 8**

### **DISEÑO DEL ESTUDIO**

#### **8.1 Tipo de muestreo**

Muestreo no probabilístico por conveniencia.

#### **8.2 Criterios de selección**

##### **Criterios de inclusión**

- Edad entre 18 y 50 años
- Sexo indistinto
- Que acepten participar en el estudio

##### **Criterios de exclusión**

- Padecer diabetes mellitus de cualquier tipo.
- Padecer enfermedades asociadas con inflamación (enfermedades autoinmunes o infecciones crónicas).

##### **Criterios de eliminación**

- Aquellos participantes en los que no se logren medir las variables de interés.



## **CAPÍTULO 9**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **9.1 Obtención de células mononucleares (CMN) de sangre venosa periférica**

A partir de un grupo de sujetos sanos (n=12) que aceptaron participar en el estudio y dieron su consentimiento verbal, se obtuvieron 25 mL de sangre venosa periférica en tubos con EDTA. Las CMN se separaron por gradiente de densidad utilizando Ficoll, el cual tiene una densidad intermedia entre eritrocitos y células nucleadas circulantes, permitiendo la separación de estas últimas (56).

El protocolo de separación fue el siguiente: en tubos de 15 mL se agregaron 4 mL de Ficoll frío + 10 mL de sangre diluida 1:2 con PBS, evitando la mezcla de fases. Posteriormente se centrifugó a 1,800 rpm durante 30 minutos a 4°C, con aceleración y desaceleración lenta, para obtener un anillo de CMN en la interfaz entre Ficoll y plasma.

#### **9.2 Diferenciación de macrófagos por el método de adherencia**

Después de separar el anillo celular obtenido por densidad, las CMN se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> con medio RPMI sin glucosa (Sigma-Aldrich, Cat. R1383) suplementado con glucosa 10 mmol, suero fetal bovino al 10% (FBS, Sigma-Aldrich), penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma-Aldrich) y glutamina 2 mmol (GIBCO) a 37° C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras este periodo, los monocitos se adhieren y comienzan su diferenciación hacia macrófagos. La adherencia es característica de monocitos, pero no de linfocitos, por lo que, después 24 horas de cultivo, se realizaron lavados con *buffer* de fosfatos para remover las células no adherentes.

### **9.3 Activación de macrófagos por LPS y exposición a niveles altos de glucosa extracelular.**

Después de la diferenciación de macrófagos por el método de adherencia, se agregó medio RPMI suplementado como se indicó anteriormente, estableciendo dos condiciones experimentales: LPS 100 ng/mL + glucosa 10 mmol ó LPS 100 ng/mL + glucosa 25 mmol para evaluar el efecto de la concentración de glucosa sobre la activación de macrófagos inducida por LPS. Tras 72 horas de cultivo (día 3) se cosecharon las células adherentes por pipeteo mecánico utilizando PBS/EDTA frío (4°C); estas células en suspensión se utilizaron para los análisis posteriores.

### **9.4 Cuantificación de la expresión de ARN mensajero por RT-qPCR**

La extracción de ácidos nucleicos se realizó con el método de TRIzol-Cloroformo. Después de evaluar viabilidad por Azul Tripán, se utilizaron  $6 \times 10^5$  células para el procedimiento de extracción.

El botón celular se resuspendió en 300  $\mu$ L de TRIzol (Life Technologies, EE. UU.) con pipeteo vigoroso por 10 segundos e incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 60  $\mu$ L de cloroformo, se agitó en vórtex y se dejó en incubación por 3 minutos. Después, se centrifugó 12,000  $\times g$  por 15 minutos y al sobrenadante obtenido se agregó 150  $\mu$ L de isopropanol y se dejó en incubación por 10 minutos. Luego se centrifugó a 12,000  $\times g$  por 10 minutos y se separó el pellet (con consistencia en forma de gel), al cual se agregaron 300  $\mu$ L de etanol al 75% y previa agitación en vórtex se centrifugó a 7,500  $\times g$  por 5 minutos para obtener el pellet (con los ácidos nucleicos). Después, se dejó la muestra en evaporación a temperatura ambiente, en condiciones de esterilidad, por 8 minutos y finalmente se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua DEPC. La desnaturalización de las nucleoproteínas se llevó a cabo en Thermoblock a 55 °C por 10 minutos, previo a la cuantificación de ARN por espectrofotometría.

La retrotranscripción se realizó con el reactivo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Applied Biosystems*) utilizando 1 µg de ARN total obtenido en el paso anterior. Específicamente, la retrotranscripción se realizó en un volumen de 20 µL con en el termociclador convencional con el siguiente programa: 25 °C por 10 minutos, seguido de 37 °C por 120 minutos, luego de 85 °C por 5 minutos. Posteriormente se cuantificó la cantidad de ADN complementario por medio de espectrofotometría. Para la amplificación cuantitativa de los genes, se utilizaron las secuencias de *primers* mostrados en la tabla 1 a una concentración final de 500 nM. La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 10 µL, utilizando 100 ng de ADN complementario y el reportero SYBR Green (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems).

Previo a los ensayos de expresión de los genes de interés se realizó una curva estándar con varias concentraciones de ADN complementario para cada gen a evaluar, donde se obtuvieron los siguientes parámetros de eficiencia: SIRT1 ( $R^2=0.967$ , E=145%), AMPK ( $R^2=0.95$ , E=120%), HIF1 $\alpha$  ( $R^2=0.98$ , E=132%), GLUT1 ( $R^2=0.95$ , E=118%). Además, se realizaron curvas de temperatura para determinar la que proporcionaba mejor eficiencia de corrida para cada amplicón y su respectivo juego de *primers*. Las temperaturas de alineamiento utilizadas fueron las siguientes: SIRT1 (53.4°C), AMPK (61.2°C), HIF1 $\alpha$  (56.5°C), GLUT1 (61.2°C).

Por último, en cada ensayo de amplificación se realizó una curva de disociación para evaluar la presencia de un amplicón único. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados se normalizaron en base a la expresión del gen endógeno *GAPDH*. Los resultados obtenidos se analizaron mediante el método de Livak ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ).

**Tabla 1.** Secuencias *forward* y *reverse* de los genes evaluados.

Genes	Secuencias	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<b>GLUT1</b>	TATGTGGAGCAACTGTGTGGT	TCCGGCCTTTAGTCTCAGGA
<b>HIF1A</b>	CAAGAACCTACTGCTAATGC	TTATGTATGTGGGTAGGAGATG
<b>SIRT1</b>	AATCCAGTCATTAAAGGTCTACAA	TAGGACCATTACTGCCAGAGG
<b>AMPKA1</b>	AGGAAGAATCCTGTGACAAGCAC	CCGATCTCTGTGGAGTAGCAGT

### 9.5 Análisis de marcadores de activación por citometría de flujo

De manera paralela a la cuantificación de ARN mensajero, se evaluó la expresión de los marcadores de activación por citometría de flujo. En detalle, se incubaron  $2 \times 10^5$  células con los anticuerpos anti-CD80 PE-Cy7-A (*Applied Biosystems*), anti-CD86 Qdot 605-A (*Applied Biosystems*), anti-CD14 APC-Cy7-A (*Applied Biosystems*) y anti-CD11c APC-A (*Applied Biosystems*) durante 15 minutos a 4°C en condiciones de oscuridad. El análisis de los marcadores de activación se realizó con el citómetro de flujo LSRFortessa y el software BD FACSDiva v8.0, con adquisición de 50,000 eventos por prueba por triplicado.

### 9.6 Ensayos de fagocitosis

Para los ensayos de fagocitosis se resuspendieron  $2 \times 10^5$  macrófagos en 500 mL de medio RPMI completo en tubos de citometría estériles con las condiciones de glucosa extracelular correspondientes. Como estímulo fagocítico se utilizaron perlas de polimetilmetacrilato (PMMA, BD Biosciences) en una relación 1:5 (1 macrófago por cada 5 perlas) a 37°C durante 2 horas. Posterior a la incubación, se realizó el marcaje con los anticuerpos anti-CD14 APC-Cy7-A (*Applied Biosystems*) y anti-CD11c APC-A (*Applied Biosystems*) durante 15 minutos a 4°C, en condiciones de oscuridad finalizando con el análisis por citometría de flujo. Como control de técnica se realizó el marcaje de una muestra sin perlas PMMA.

## **9.7 Estrategia de análisis para ensayo de fagocitosis por citometría de flujo**

Para el análisis de los ensayos de fagocitosis se utilizó la siguiente estrategia: 1) se seleccionaron los eventos únicos utilizando el *dotplot* FSC-H versus FSC-A. 2) A partir de éstos y utilizando los parámetros SSC-A y FSC-A, se identificaron las células de interés por medio de los marcadores CD11c y CD14. 3) Finalmente, en este grupo celular se evaluó el aumento de la complejidad celular, medido con el parámetro SSC-A, como método de identificación de células fagocíticas.

## **9.8 Análisis estadístico**

Una vez obtenidos los datos se procedió a la captura de las variables de interés y se verificó la calidad de la base de datos. El análisis estadístico de los resultados se realizó con el software GraphPad Prism versión 5. Primero, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar el tipo de distribución de los datos. Los valores descriptivos de centro y dispersión se utilizaron de acuerdo con la distribución de los datos. Para comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba t-Student y la prueba U de Mann-Whitney para datos paramétricos y no paramétricos, respectivamente. La significancia estadística se consideró con un valor de  $p < 0.05$ .

## **9.9 Análisis e interpretación de la información**

El procesamiento de las muestras para análisis de fenotipo y ensayo de fagocitosis se llevó a cabo en el citómetro de flujo LSRFortessa. La medición de expresión relativa de genes se realizó en el Termociclador en tiempo real CFX96 Touch de BioRad.

El análisis e interpretación de los resultados estuvo a cargo de:

- Dr. C. Mario César Salinas Carmona (Investigador Principal)
- Dr. C. Manuel Mejía Torres (Co-director)
- Dra. C. Anna Velia Vázquez Marmolejo (Miembro de la comisión)
- L. N. Kenia Yaretzy Osuna Espinoza (Tesisista de Maestría)

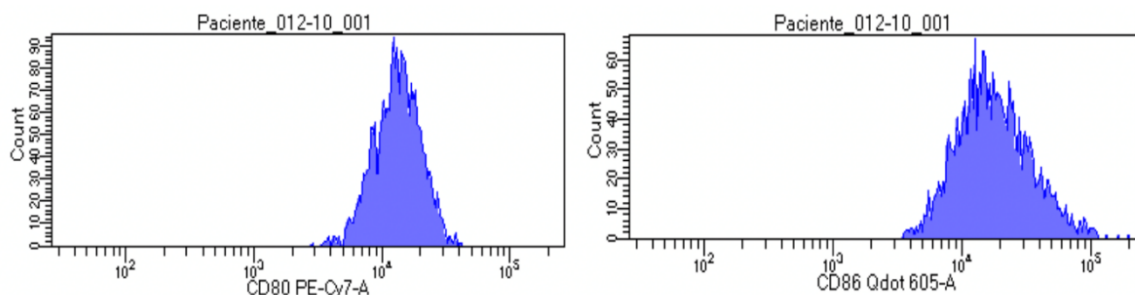
## CAPÍTULO 10

### RESULTADOS

Al finalizar las 72 horas totales de cultivo se cosecharon las células con PBS/EDTA frío y se realizó el conteo celular en cámara de *Neubauer* tomando 10 mL de suspensión celular + 90 mL de azul tripano. Una vez realizado el conteo se colocaron  $2 \times 10^5$  células en tubos estériles de citometría para su posterior análisis en el citómetro de flujo LSRFortessa. En total se analizaron 4 tubos de citometría por muestra, un grupo control y un grupo de fagocitosis para cada condición de concentración de glucosa; se realizó el marcaje con los anticuerpos de interés (CD80, CD86, CD14 y CD11c) durante 15 minutos, a 4°C y en condiciones de oscuridad.

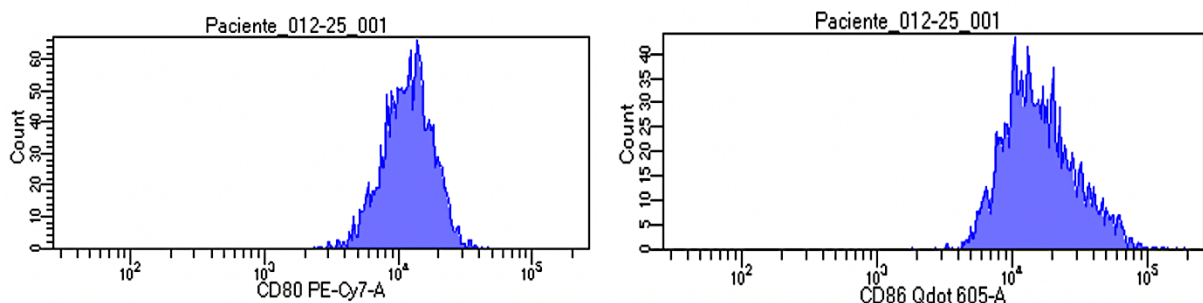
#### 10.1 Comparación de la expresión de marcadores de activación CD80 y CD86 entre condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.

Una vez analizadas todas las muestras se identificó la media de expresión en células cultivadas en concentración de glucosa 10 mmol. El marcador de activación CD80 mostró una intensidad media de fluorescencia de 38351 ( $\pm$  DE 6822), mientras que la expresión del marcador de superficie CD86 fue de 24466 ( $\pm$  DE 2086) (figura 4). Estos resultados se tomaron como medición basal para su posterior comparación con la condición de glucosa 25 mmol.



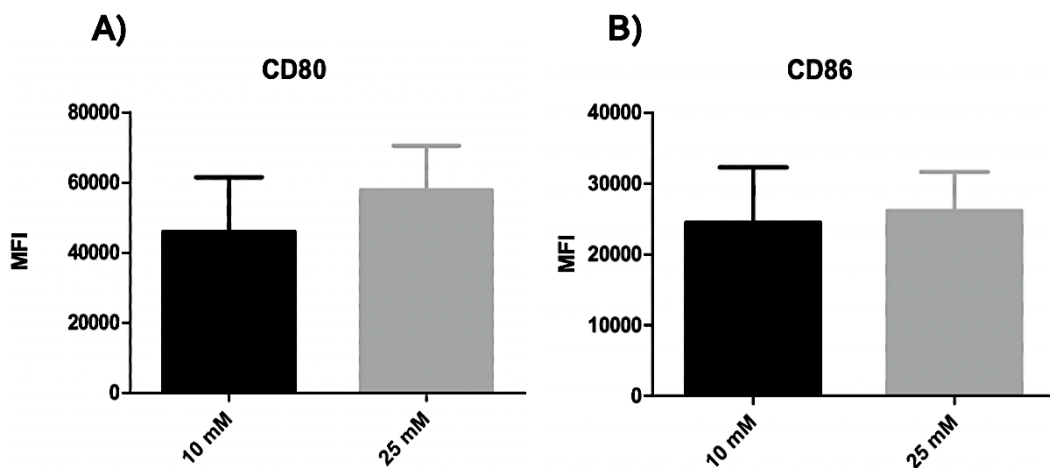
**Figura 4.** Imágenes representativas de la intensidad media de fluorescencia de CD80 y CD86 obtenida de una muestra en concentración de glucosa 10 mmol.

Posteriormente se identificó la media de expresión en células cultivadas en concentración de glucosa alta (25 mmol). El marcador de activación CD80 mostró una intensidad media de fluorescencia de 44367 ( $\pm$  DE 7827), mientras que la expresión del marcador CD86 fue de 26148 ( $\pm$  DE 1417) (figura 5).



**Figura 5.** Imágenes representativas de la intensidad media de fluorescencia de CD80 y CD86 obtenida de una muestra en concentración de glucosa 25 mmol.

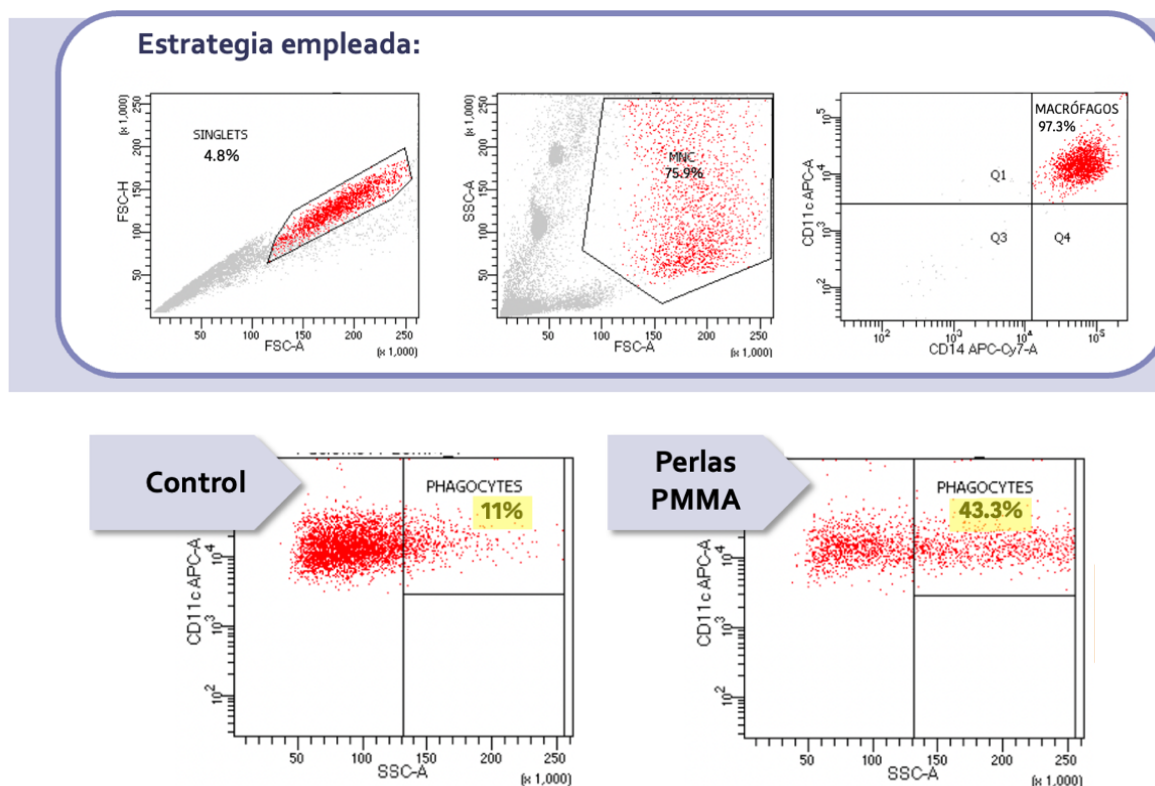
Estos resultados se compararon con los obtenidos en la condición de glucosa 10 mmol sin observarse diferencias en intensidad media de fluorescencia entre condiciones de concentración de glucosa,  $p=0.5054$  (figura 5).



**Figura 6.** Comparación de la expresión de marcadores de activación CD80 y CD86 entre condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol. *MFI: Intensidad Media de Fluorescencia.* A) Mann-Whitney U-Test ( $p=0.6784$ ), B) *t*-Student ( $p=0.5054$ ),  $n=10-12$ .

## 10.2 Comparación de la capacidad fagocítica entre macrófagos activados con LPS en condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.

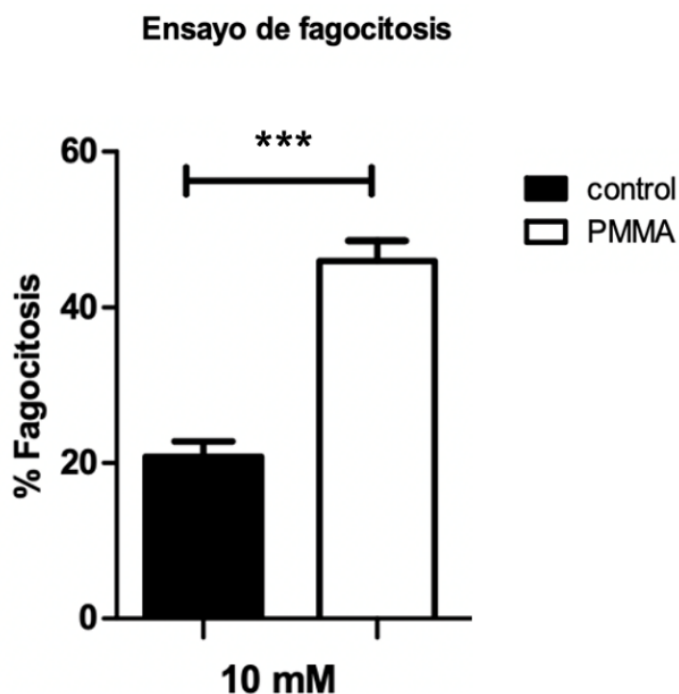
Posterior a la incubación durante 2 horas con las perlas de PMMA las células cultivadas en glucosa 10 mmol fueron marcadas con los anticuerpos de interés y se siguió la siguiente estrategia de análisis: en base a parámetros de morfología (FSC-A y SSC-A) se seleccionaron las células mononucleares como población de interés, posteriormente empleando los marcadores CD14 y CD11c se identificaron las células dobles positivas (macrófagos). A partir de los macrófagos identificados y con ayuda de parámetros de morfología se utilizó una estrategia de intervalo para determinar el porcentaje de células fagocíticas (Figura 6).



**Figura 7.** Imágenes representativas de una muestra para la estrategia de análisis empleada en el citómetro de flujo LSRFortessa.



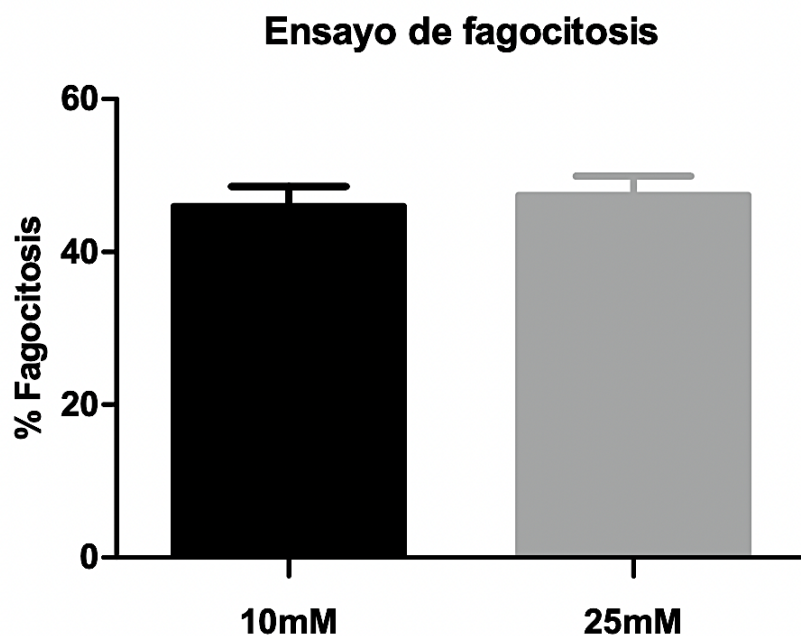
En la condición de glucosa 10 mmol, las células incubadas en ausencia de perlas PMMA presentaron un valor medio del porcentaje de fagocitos de 20.7% ( $\pm$  DE 1.9%), mientras que las células incubadas con perlas PMMA mostraron una media del porcentaje de fagocitos de 45.9% ( $\pm$  DE 2.5%), observándose diferencias estadísticamente significativas entre las dos condiciones ( $p < 0.001$ , gráfica 2).



**Gráfica 2.** Porcentaje de células fagocíticas en concentración de glucosa 10 mmol.

*PMMA: Polimetilmetacrilato. t-Student ( $p < 0.001$ ),  $n = 10-12$ .*

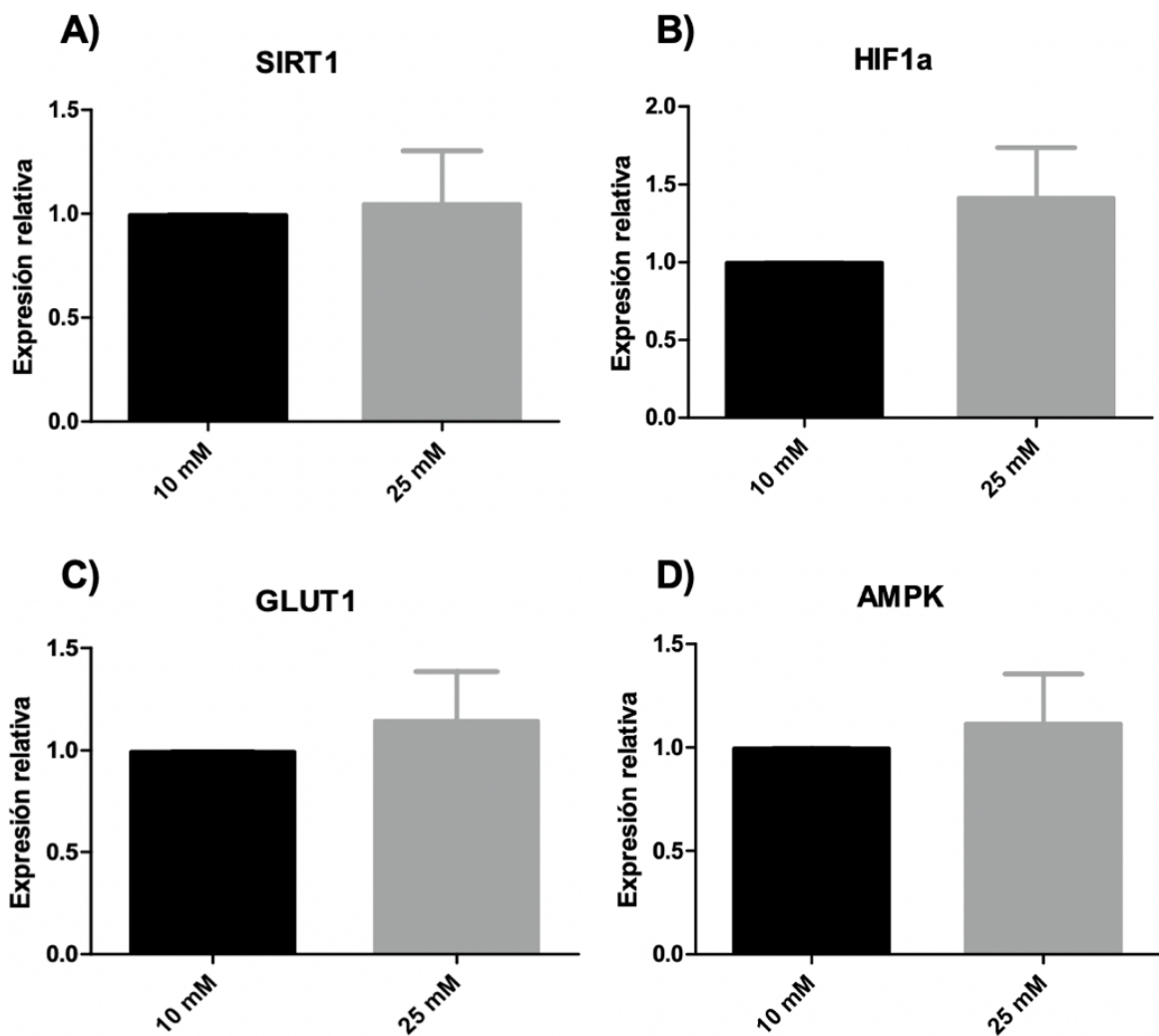
Posteriormente se empleó la estrategia antes mencionada para analizar el porcentaje de fagocitos en la condición de glucosa 10 mmol y se comparó con los datos obtenidos en la condición de glucosa 25 mmol, sin observarse diferencias significativas entre grupos,  $p = 0.7016$  (figura 8).



**Gráfica 3.** Comparación del porcentaje de fagocitos en células cultivadas en condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol. Prueba *t-Student* ( $p=0.7016$ ),  $n=10-12$ .

### 10.3 Comparación de la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria entre las condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.

Por medio de RT-qPCR, se evaluó la expresión de los genes de interés *SIRT1*, *HIF1a*, *GLUT1* y *AMPK* respecto al gen de referencia *GAPDH*. No se observaron diferencias significativas al comparar la expresión de estos genes entre condiciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol,  $p>0.05$  (figura 9).



**Gráfica 4.** Comparación de la expresión relativa de SIRT1, HIF1 $\alpha$ , GLUT1 y AMPK entre macrófagos cultivados en concentraciones de glucosa 10 mmol y 25 mmol.

*Prueba t-Student, n=10-12. A)  $p=0.8402$ , B)  $p=0.2136$ , C)  $p=0.5423$ , D)  $p=0.6211$ .*

## CAPÍTULO 11

### DISCUSIÓN

Los macrófagos son células de la inmunidad innata que desempeñan un papel importante como mediadores de la inflamación. Estas células son capaces de evaluar su entorno y responder a cambios en el microambiente de manera efectiva ante estímulos nocivos como los derivados de patógenos, mediante la realización de cambios metabólicos que suministren energía y así montar una respuesta de activación. Actualmente se conoce que los macrófagos del fenotipo M1 llevan a cabo la obtención de energía por glucólisis anaerobia; mientras que los macrófagos del fenotipo M2 cambian su metabolismo hacia la glucólisis aerobia y la fosforilación oxidativa. De esta manera, se establece una estrecha relación entre metabolismo y fenotipo de activación celular, donde los cambios en el metabolismo pueden inducir cambios en las funciones efectoras de los macrófagos.

La mayoría de los estudios realizados a la fecha en el área de inmunometabolismo se han centrado en modelos que evalúan la relación entre metabolismo e inflamación. Por ejemplo, en el año 2016, Torres-Castro y colaboradores publicaron un estudio *in vivo* donde compararon la expresión de marcadores de superficie M1 y M2 en macrófagos derivados de pacientes con diabetes. Estos marcadores y la producción de citocinas indicaron la asociación entre hiperglucemia y fenotipo inflamatorio (2). Otros estudios han tratado de evaluar el metabolismo de macrófagos ante diversos estímulos infecciosos, pero aún se desconocen los mecanismos celulares que llevan a estos cambios.

En este trabajo se evaluaron los cambios en la expresión de genes metabólicos en macrófagos expuestos a concentraciones altas de glucosa. La asociación estrecha entre metabolismo celular, activación de macrófagos e inflamación permite estudiar los mecanismos inflamatorios asociados a las enfermedades metabólicas como diabetes y dislipidemias. Las condiciones de glucosa estudiadas se eligieron en base a lo reportado en la literatura; estudios anteriores han utilizado concentraciones de glucosa

que van de 25 a 40 mmol/L (450-720 mg/dL), simulando los niveles que se pueden encontrar en un paciente diabético con pobre control metabólico. En cuanto a las concentraciones de glucosa consideradas normales o basales, los estudios previos han utilizado entre 5.5 y 11.1 mmol/L (100-200 mg/dL), sin encontrar diferencias en cuanto a las características medidas, sean éstas expresión genética, producción de citocinas o activación celular (57). Por lo anterior, en el presente trabajo se utilizó glucosa 10 mmol como nivel basal (cercana a la concentración de glucosa del medio RPMI-1640 que es de 11.1 mmol/L) y glucosa 25 mmol como concentración alta.

Las características celulares medidas incluyeron la expresión de marcadores de activación CD80 y CD86, el porcentaje de células fagocíticas (con el uso de perlas de polimetilmetacrilato) y la expresión relativa de genes identificados en la literatura como reguladores del metabolismo e inflamación (*SIRT1*, *HIF1A*, *AMPK* y *GLUT1*).

En nuestro estudio no encontramos diferencias en la expresión de los marcadores de activación CD80 y CD86; anterior a este estudio ningún otro trabajo ha evaluado la expresión de estos marcadores de activación, tras el estímulo con glucosa elevada. Los resultados obtenidos pudieran explicarse por el hecho de que ambos grupos recibieron el estímulo activador con LPS junto al de glucosa y éste es más intenso que la concentración de glucosa en el medio extracelular.

La capacidad fagocítica de los macrófagos se evaluó por citometría de flujo. A la fecha la mayoría de los estudios que evalúan capacidad fagocítica emplean el método de recuento en cámara de Neubauer, sin embargo, éste requiere mayor tiempo, tiene mucha variabilidad y un bajo rendimiento ya que sólo se puede manejar un número limitado de muestras.

Estudios recientes utilizan métodos de cuantificación fagocítica por citometría de flujo empleando perlas de materiales inertes como látex, poliestireno y polimetilmetacrilato, porque son métodos cuantitativos fiables y reproducibles (58). Por lo anterior, es que en nuestro estudio decidimos llevar a cabo el ensayo de fagocitosis por citometría de flujo como un método cuantitativo confiable para determinar el porcentaje de células

fagocíticas. A diferencia de otros estudios que emplean perlas de látex marcadas con fluorocromos, nosotros utilizamos las de PMMA y anticuerpos anti-CD11c y anti-CD14, para delimitar la población de interés y, en base a morfología, determinar el porcentaje de fagocitos. Esto porque las células fagocíticas cambian su morfología al fagocitar las perlas de PMMA, volviéndose más granulares, característica que puede cuantificarse por citometría de flujo.

En un estudio realizado por Pavlou y colaboradores en 2018 se evaluó la capacidad fagocítica de macrófagos murinos mediante un ensayo cuantitativo en microplacas de fluorescencia. No se reportaron diferencias significativas entre macrófagos cultivados en condiciones de glucosa normal y glucosa alta tras una exposición breve (24 horas); sin embargo, después de establecer una exposición más larga (7 días), la capacidad fagocítica de macrófagos cultivados en condiciones de glucosa alta (30 mmol/L) fue significativamente menor (59).

Por nuestra parte, la exposición al estímulo de glucosa alta empleada en este trabajo fue de 72 horas, tiempo menor al reportado como exposición a largo plazo, en donde las diferencias entre grupos fueron evidentes. Esto sugiere que, para observar cambios en la capacidad fagocítica entre macrófagos cultivados en concentraciones de glucosa normal o alta es necesario una exposición crónica al estímulo, como mínimo de 72 horas.

Cuando se evaluó la expresión de *SIRT1* tras el estímulo con glucosa alta por 72 horas no se observaron diferencias entre grupos. Estos resultados concuerdan con los reportados por Jia y colaboradores en el 2015, quienes evaluaron los cambios en la expresión relativa de *SIRT1* tras la exposición a glucosa alta (30 mmol) a diferentes tiempos, observando que durante las primeras 24 horas de cultivo el estímulo de glucosa alta es suficiente para disminuir significativamente los niveles de *SIRT1* en macrófagos de la línea celular RAW264.7. Sin embargo, posterior a las 24 horas se mostró una recuperación de los niveles de *SIRT1* hasta llegar a niveles basales a las 48 horas de cultivo. Estos cambios observados a nivel de ARNm en *SIRT1* fueron

también evidentes a nivel de proteína y no relacionados con los cambios en la concentración de glucosa extracelular (57).

Datos similares se observaron con el resto de los genes evaluados: *HIF1a*, *GLUT1* y *AMPK*, después de cultivar los macrófagos en condiciones de glucosa 25 mmol durante 72 horas, no se perciben cambios en la expresión de estos genes clave en la regulación metabólica e inflamatoria. En un estudio realizado por Aki y colaboradores en macrófagos murinos RAW264.7 estimulados con LPS y cultivados en condiciones de glucosa alta (4.5 g/L), se reportó la disminución significativa de *HIF1a* durante las primeras 24 horas de cultivo; sin embargo, no se evaluaron los niveles de *HIF1a* tras una exposición a largo plazo (60).

Respecto a *AMPK*, regulador clave del metabolismo, los datos reportados a la fecha se centran en evaluar su relación como regulador inflamatorio (asociando su expresión con niveles de citocinas proinflamatorias). Sin embargo, algunos estudios de importancia han evaluado el efecto de las condiciones de exceso de nutrientes sobre la expresión de este gen.

Yang y colaboradores observaron disminución en los niveles de *AMPK* en macrófagos murinos RAW264.7 cultivados en exceso de ácidos grasos libres durante 24 horas, similar a la reducción observada tras el estímulo inflamatorio con LPS (61). Estos datos establecen una estrecha relación entre este regulador metabólico, el exceso de nutrientes y la inflamación.

Por otra parte, Kurihara y colaboradores evaluaron la expresión de *GLUT1* y demostraron que tras una exposición crónica por 7 días al estímulo de glucosa alta (15.5 mmol) no encontraron diferencias en la expresión relativa de *GLUT1* (62), en macrófagos murinos RAW264.7, similar a los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Es importante mencionar que los genes evaluados en nuestro trabajo (*SIRT1*, *HIF1a*, *GLUT1* y *AMPK*) forman parte de la misma vía de señalización intracelular, aunque a diferentes niveles, por lo que es plausible esperar un comportamiento similar al

observado en el trabajo de Jia y colaboradores sobre la expresión de *SIRT1* después del estímulo a glucosa alta en el resto de los genes, sin embargo, la información no es concluyente.

Si bien son pocos los estudios que han evaluado la expresión de estos genes como reguladores clave del metabolismo e inflamación, estos resultados nos brindan un panorama general del comportamiento de estos sensores metabólicos en un escenario de glucosa elevada.



## **CAPÍTULO 12**

### **CONCLUSIÓN**

En un ensayo *in vitro* de diferenciación de macrófagos activados con LPS, a partir de células mononucleares humanas, la activación celular, la fagocitosis y la transcripción de genes metabólicos no se modifican tras la exposición a niveles altos de glucosa (25 mM) durante 72 horas. Se rechaza la hipótesis de que el aumento en la concentración de glucosa extracelular cambia la expresión de genes de regulación metabólica e inflamatoria.

## **CAPÍTULO 13**

### **PERSPECTIVAS**

- Evaluar la expresión relativa de genes en una cinética de las primeras 24 horas de cultivo para evaluar los cambios transcripcionales a corto plazo.
- Valorar muestras de pacientes con diabetes tipo 2 para evaluar el efecto de la exposición a glucosa alta *in vivo* sobre los genes de interés.
- Incluir grupos sin el estímulo con LPS para evaluar el efecto aislado de la glucosa sobre la expresión relativa de genes.
- Incluir otros genes relacionados con inflamación y metabolismo no considerados en este trabajo.

## REFERENCIAS

1. Diabetes Impl. World Health Organization. [Online].; 2016 [cited 2021 Junio 08. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO\\_NMH\\_NVI\\_16.3\\_spa.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204877/WHO_NMH_NVI_16.3_spa.pdf?sequence=1).
2. Torres-Castro I, Arroyo-Camarena , D. Ú, Martinez-Reyes CP, Gomez-Arauz AY, Dueñas-Andrade Y, et al. Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose. Immunology Letters. 2016;; p. 81-89.
3. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. Nature Reviews Endocrinology. 2018; 14: p. 88-98.
4. Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. Diabetes Research and Clinical Practice. 2017;; p. 40-50.
5. 2018 ENdSyN. ENSANUT. [Online].; 2018 [cited 2021 Enero 16. Available from: [https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut\\_2018\\_presentacion\\_resultados.pdf](https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf).
6. Hernandez-Avila, Mauricio; Gutierrez, Juan Pablo; Reynoso-Noveron, Nancy. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. Salud Pública de México. 2013; 55(2).
7. Ojo O. Dietary Intake and Type 2 Diabetes. Nutrients. 2019; 11(2177).
8. Treuter E, Fan R, Huang Z, Jakobsson T, Venteclef N. Treuter E, Fan R, Huang Z, Jakobsson T, Venteclef N. Transcriptional repression in macrophages—basic mechanisms and alterations in metabolic inflammatory diseases. FEBS Letters. 2017;; p. 2959-2977.
9. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. Inflammation Research. 2016; 65(1).

10. Day E, Ford R, Steinberg G. AMPK as a Therapeutic Target for Treating Metabolic Diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017.
11. Morris D. Minireview: Emerging Concepts in Islet Macrophage Biology in Type 2 Diabetes. 2015; 29(7).
12. van Diepen J, Thiem K, Stienstra R, Riksen N, Tack C, Netea M. Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggressive? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;; p. 4675-4684.
13. Diskin C, Palsson-McDermott EM. Metabolic Modulation in Macrophage effector Function. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9: p. 1-17.
14. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 2011 November; 11.
15. Saha S, Shalova N, Biswas K. Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. *Immunological Reviews*. 2017.
16. Kraakman M, Murphy A, Jandeleit-Dahm K, Kammoun H. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function? *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(470).
17. Viola A, Munari F, Sanchez-Rodriguez R, Scolaro T, Castegna A. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in Immunology*. 2019; 10: p. 1-16.
18. Van den Bossche J, Baardman J, Otto NA, Hoeksema A, de Vos AF, P.J. de Winther. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Reports*. 2016; 17: p. 684-696.
19. Jafar N, Edriss H, Nugent K. The effect of short-term hyperglycemia on the innate immune system. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2016 February; 351(2).
20. Daryabor G, Atashzar M, Kabelitz D, Meri S, Kalantar K. The effects of type 2 diabetes mellitus on organ metabolism and the immune system. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11(1582).
21. Berbudi A, Rahmadika N, Tjahjadi A, Ruslami R. Type 2 diabetes and its impact on the immune system. *Current Diabetes Reviews*. 2020; 16.

22. Jin X, Yao T, Zhou Z, Zhu J, Zhang S, Hu W, et al. Advanced Glycation End Products Enhance Macrophages Polarization into M1 Phenotype through Activating RAGE/NF- $\kappa$ B Pathway. *BioMed Research International*. 2015;; p. 1-12.
23. Lachmandas E, Vrieling F, Wilson LG, Joosten A, Netea MG, Ottenhoff TH, et al. The Effect of Hyperglycaemia on In Vitro Cytokine Production and Macrophage Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos One*. 2015; 10(2): p. 1-13.
24. Suzuki H, Hisamatsu T, Chiba S, Mori K, Kitazume MT, Shimamura K, et al. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. *Immunology Letters*. 2016;; p. 18-27.
25. Watanabe R, Hilhorst M, Zhang H, Zeisbrich M, Berry G, Wallis B, et al. Glucose metabolism controls disease-specific signatures of macrophage effector functions. *JCI Insight*. 2018; 3(20).
26. Cipolleta C, Ryan K, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral Blood CD14+ Monocytes Occurs in Diabetes. *Diabetes*. 2005 September; 54.
27. Loftus R, Finlay D. Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *The Journal of Biological Chemistry*. 2016; 291(1).
28. P. P. Otto Warburg: "on the origin of cancer cells". *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1957; 10(4).
29. Wang S, Liu R, Yu Q, Dong L, Bi Y, Liu G. Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer. *Cancer Letter*. 2019;; p. 14-22.
30. O'Neill LA, Pearce EJ. Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med*. 2016; 213(1): p. 15-23.
31. Biswas S, Mantovani A. Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metabolism*. 2012.
32. Blagih J, Jones RG. Polarizing Macrophages through Reprogramming of Glucose Metabolism. *Cell Metabolism*. 2012 June.
33. Curi R, de Siqueira Mendes R, de Campos Crispin L, Norata G, Coccuzzo S, Newsholme P. A past and present overview of macrophage metabolism and functional outcomes. *Clinical Science*. 2017; 131.

34. Izquierdo E, Delgado Cuevas V, Fernandez-Arroyo S, Riera-Borrull M, Orta-Zavalza E, Joven J, et al. Reshaping of Human Macrophage Polarization through Modulation of Glucose Catabolic Pathways. *The Journal of Immunology*. 2015; 195: p. 2442-2451.
35. Chiba S, Hisamatsua T, Suzuki H, Mori K, Kitazumea MT, Shimamuraa K, et al. Glycolysis regulates LPS-induced cytokine production in M2 polarized human macrophages. *Immunology Letters*. 2017.
36. Mills EL, O'Neil LA. Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal. *European Journal of Immunology*. 2016; 46(1).
37. Thapa B, Lee K. Metabolic influence on macrophage polarization and pathogenesis. *BMB Reports*. 2019; 52(6).
38. Artyomova MN, Sergushichev A, Schilling JD. Integrating immunometabolism and macrophage diversity. *Seminars in Immunology*. 2016.
39. Van den Bossche J, O'Neill L, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends in Immunology*. 2017; 38(6).
40. Galvan-Peña S, O'Neill L. Metabolic reprograming in macrophage polarization. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5(420).
41. Langston K, Shibata M, Horng T. Metabolism Supports Macrophage Activation. *Frontiers of Immunology*. 2017; 8(61): p. 1-7.
42. Lyons CL, Roche M. Nutritional Modulation of AMPK-Impact upon Metabolic-Inflammation. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19.
43. Huang J, Liu K, Zhu S, Xie M, Kang R, Cao L, et al. AMPK regulates immunometabolism in sepsis. *Brain Behav Immun*. 2018; 72(1).
44. Yang , Kahn B, Shi H, Xue BZ. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem*. 2010; 285(25).
45. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2014; 25(3).

46. Prabhakar P, Singh K, Kabra D, Gupta J. Natural SIRT1 modifiers as promising therapeutic agents for improving T diabetic wound healing. *Phytomedicine*. 2020; 76.
47. Yamagata K, Yoshizawa T. Transcriptional Regulation of Metabolism by SIRT1 and SIRT7. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2018; 335.
48. Singh V, Ubaid S. Role of Silent Information Regulator 1 (SIRT1) in Regulating Oxidative Stress and Inflammation. *Inflammation*. 2020.
49. Jia Y, Zheng Z, Wang Y, Zhou Q, Cai W, Jia W, et al. SIRT1 Is a Regulator in High Glucose-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Cells. *PLOS one*. 2015; 10(3).
50. Li Y, Ni J, Guo R, Li W. In Patients with Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes, SIRT1 Expression in Circulating Mononuclear Cells Is Associated with Levels of Inflammatory Cytokines but Not with Coronary Lesions. *BioMed Research International*. 2016.
51. Liu L, Zhu X, Zhao T, Yu Y, Xue Y, Zou H. Sirt1 ameliorates monosodium urate crystal-induced inflammation by altering macrophage polarization via the PI3K/Akt/STAT6 pathway. *Rheumatology*. 2019; 58(9).
52. Li T, Garcia-Gomez A, Morante-Palacios O, Ciudad L, Ozkaramehmet S, Van Dijck E, et al. SIRT1/2 orchestrate acquisition of DNA methylation and loss of histone H3 activating marks to prevent premature activation of inflammatory genes in macrophages. *Nucleic Acids Research*. 2020; 48(2).
53. Qu B, Gong K, Yang H, Li Y, Jiang T, Zeng Z, et al. SIRT1 suppresses high glucose and palmitate-induced osteoclast differentiation via deacetylating p66Shc. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018; 474.
54. Yu Q, Dong L, Li Y, Liu G. SIRT1 and HIF1a signaling in metabolism and immune responses. *Cancer Letters*. 2018; 418.
55. Wang T, Liu H, Lian G, Zhang SY, Wang X, Jiang C. HIF1 $\alpha$ -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators of Inflammation*. 2017.

56. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97(1): p. 77-89.
57. Jia Y, Zheng Z, Wang Y, Zhou Q, Cai W, Jia W, et al. SIRT1 Is a Regulator in High Glucose-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Cells. *PLOS ONE.* 2015; 10(3).
58. Dagher Z, Xu S, Negoro P, Khan N, Feldman M, Reedy J, et al. Fluorescent Tracking of Yeast Division clarifies the essential role of spleen Tyrosine Kinase in the intracellular control of *Candida glabrata* in Macrophages. *Frontiers in Immunology.* 2018; 9(1058).
59. Pavlou S, Lindsay J, Ingram R, Xu H, Chen M. Sustained high glucose exposure sensitizes macrophage responses to cytokine stimuli but reduces their phagocytic activity. *BMC Immunology.* 2018; 19(24).
60. Aki T, Funakoshi T, Noritake K, Unuma K, Uemura K. extracellular glucose is crucially involved in the fate decision of LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cells. *Scientific Reports Nature.* 2020; 10(10581).
61. Yang Z, Kahn BB, Shi H, Xue Bz. Macrophage  $\alpha 1$  AMP-activated Protein Kinase ( $\alpha 1$ AMPK) Antagonizes Fatty Acid-induced Inflammation through SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry.* 2010; 285(25).
62. Kurihara C, Tanaka T, Yamanouchi D. Hyperglycemia attenuates receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand-induced macrophage activation by suppressing of insulin signaling. *Journal of Surgical Research.* 2017.



## **ANEXOS**

### **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

**L.N. Kenia Yaretzy Osuna Espinoza**

Candidata para obtener el Grado de Maestra en Ciencias con Orientación en  
Inmunología Médica.

**Tesis: EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EXTRACELULAR  
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE REGULACIÓN METABÓLICA Y LA  
DIFERENCIACIÓN DE MACRÓFAGOS CON LPS *IN VITRO*.**

**Campo de Estudio:** Ciencias de la Salud

**Datos Personales:** Nacida en Culiacán, Sinaloa, México el 12 de octubre de 1995,  
hija de Ignacio Osuna Ramírez y Juany Espinoza Calderón.

**Educación:** Graduada con honores de la Facultad de Ciencias de la Nutrición y  
Gastronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, grado obtenido Licenciada en  
Nutrición en 2018.